

Válasz Dr. Juhász Gábor az MTA doktora, tudományos tanácsadó szakmai bírálatára

Mindenekelőtt meg szeretném köszönni opponensemnek, hogy elvállalta a benyújtott pályázatom bírálatát. Köszönöm megjegyzéseit (amelyekkel egyetértek, és elfogadom) kritikai észrevételeit, amelyek közül csak egyre szeretnék reflektálni. Bírálom hiányolja, hogy a különböző gátlószeres kezelések mellett semmilyen géncsendesítési, génszerkesztési technikákat nem alkalmaztam. Tekintettel arra, hogy disszertációm a munkásságom 2009-ig terjedő időszakának eredményeit foglalja össze, abban az időben a gén-manipulációs, géncsendesítési technikák még „gyerekcipőben” jártak, nem voltak elterjedt vizsgálati módszerek. Jelenleg folyó vizsgálataink során már mi is tervezzük micro- és siRNS-ek alkalmazását.

Opponensem a fő tudományos eredményeim összefoglalása végén megjegyzi, hogy nem találta Ari Helenius 2010-ben megjelent cikkében a munkámra való hivatkozást. A munkát Ari Helenius munkacsoportja végezte, Ari Helenius, mint munkacsoport vezető a J Cell Biol (191. 615-629) 2010-ben megjelent „*Caveolin-1 is ubiquitinated and targeted to intraluminal vesicles in endolysosomes for degradation*” c. cikk utolsó szerzője, az első szerző Arnold Hayer, Ennek a publikációnak a végén a *References* fejezetben a szerzők idézik 2007-ben és 2009-ben megjelent, Botos Erzsébettel közös publikációinkat. Ennek a publikációnak *Discussion* fejezetében szerepelnek az alábbi mondatok: „*The electron micrographic sections showing structures with many caveolar domains most likely represent structures still connected to the plasma membrane (Parton and Simons 2007; Kiss and Botos 2009). We emphasize that caveosomes according to present data are most likely modified LE/LYS and thus part of the classical endocytic pathway. We suggest that the term caveosomes no longer be used.*”

Opponensem kérdéseire adott válaszaim a következők:

1.) „*Hatással van-e a caveolák száma/jelenléte a makrofágok fagocita aktivitására?*”

A disszertációmban összefoglalt munkámban a makrofágok fagocitotikus folyamatait nem vizsgáltam, de fluid fázisos és receptor-mediált endocitózist igen. Eredményeim azt mutatták, hogy az elicitált (gyulladásos) makrofágok, amelyekben a clathrin burkos vezikulák száma nem változott, a caveolák száma viszont igen jelentősen megnőtt, lényegesen nagyobb mennyiségben vesznek fel fluid fázisos markert és immunkomplexekeket. Ezek az eredmények mindenképpen azt jelzik, hogy az endocitotikus aktivitás és a caveolák száma között szoros összefüggés van, azonban arra nehéz válaszolni, hogy azért van több caveola ezen makrofágok plazmamembránján, hogy a nagyobb aktivitáshoz elegendő számú felvételi struktúra álljon rendelkezésre, vagy azért fokozottabb az endocitózis, mert a sok caveola nagyobb mennyiségű anyagfelvételt képes elvégezni. Irodalmi adatok azt mutatják, hogy a caveolák, illetve a caveolin-1 fehérje az endocitózisban betöltött szerepük mellett a makrofágok

működésének, a monocita-makrofág differenciálódásnak egyik kulcsfontosságú szabályozó fehérjéje. Overexpressziója gátolja a migrációt, és stimulálja a fagocitózist (Fu és mtsai 2012). A caveolin-1 a makrofágok egyik legfontosabb immunmodulátora (Wang és mtsai 2005), közvetlenül szabályozva a gyulladásos válaszokat. A gyulladás során expresszáldó caveolin-1 a p38/MAPK útvonal aktiválásán keresztül gátolja a pro-inflammatorikus citokinek (TNF α és az IL-6) termelődését, és fokozza az anti-inflammatorikus citokin (IL-10) termelést (Xiao és mtsai 2005), ezáltal védő szerepet játszik a gyulladásos folyamatokban. A caveolin-1 fontos szerepet játszik a monocita-makrofág differenciációban is. A monocita-makrofág differenciációt számos transzkripciós faktor szabályozza, amelyek közül az EGR1 csak a monocita-makrofág átalakulásra hat. Ezen átalakulás egyik fontos feltétele az EGR1 transzkripciós faktor aktiválódása. Az aktiválódott EGR1 fokozza a CD115 expresszióját, amely elősegíti az M-CSF jelátvitelt. Az EGR1 transzkripciós faktor nukleáris transzlokációja az ERK aktivitásától függ, amelyet viszont a caveolin-1 szabályoz. (Fu és mtsai 2012).

„Milyen adatok vannak a felhasznált ellenanyagok specifikására (pl. történt-e Szerző vagy mások által végzett validálás, azaz hogy géncsendesített sejtekben lecsökkent az adott fehérje mennyisége mikroszkópos vagy western blot vizsgálatokban)?”

Mi ilyen validálási vizsgálatokat nem végeztünk, tekintettel arra (amint azt már említettem), hogy a disszertációmban összefoglalt vizsgálatok idején géncsendesítéses kísérleteket nem végeztünk. Az utóbbi időben azonban számos publikáció jelenik meg géncsendesítéssel végzett vizsgálatokról, amelyekben ugyanazokat az antitesteket használják, amelyeket mi is ugyanazoktól a cégektől vásárolunk. A specifikással kapcsolatosan minden alkalommal a klasszikus ellenőrzést végeztük el, nevezetesen minden esetben vizsgáltuk, hogy az első ellenanyag elhagyása után kapunk-e jelet, vagy sem.

„A dolgozat elsősorban emlős sejteket vizsgált, nem említi, hogy milyen más fajokban vannak jelen ezek a struktúrák/caveolint kódoló gének. A bemutatott génredundancia (caveolin-1, -2, -3 jelenléte) kapcsán felmerül bennem, hogy ismert-e olyan faj, aminek csak egyetlen caveolint kódoló génje van, és milyen fenotípust okoz ennek kiütése (ha ezt vizsgálta valaki)?”

A caveolin izoformákat elsőként emlős sejtekben írták le (caveolin-1: 1953-ban, caveolin-2 és caveolin-3: 1996-ban), funkciójukat, expressziójukat főleg emlős sejtekben vizsgálták. Mindhárom izoformát leírták *Xenopus laevis*-ben, *Fugu rubripes*-ben és *Caenorhabditis elegans*-ban is. A *C. elegans*-ban Sato és mtsai (2006) által kimutatott caveolin-1 az emlősökben jelen lévő caveolin-3 izoformával homológ, idegsejtekben, izomban van jelen. Scheel és mtsai (1999) leírták, hogy a caveolin-1 *C. elegans*-ban hímeknél az ivarsejtérést szabályozza. 2008-ban Hernandez-Bello és mtsai

caveolin-1 gént klónozott *Trichinella spiralis*ban, fragment specifikus cDNS próbával kimutatta a caveolin-1 sex-specifikus expresszióját a petesejt érése és a korai embrionális fejlődés során. Zhang és mtsai (2011) caveolin-1 gént klónozott Arthropodában (*Artenesia sinica*). Sokáig tartotta magát az a nézet, hogy *Drosophilákban* nincs jelen a caveolin. 2016-ban azonban Zhang és mtsai *Drosophilában* is (felnőttben és lárvában egyaránt) kimutatták a caveolin-1 izoformát. Eloszlása, expressziója változik a különböző fejlődési stádiumokban: felnőttben főleg agyban, izomban és a bélcsőben van jelen, bábállapotban a zsírtestben találták a legtöbb caveolin-1-t, az agyban viszonylag kevés volt kimutatható. Lárvákban és bábokban a caveolin-1 expressziója magasabb volt, mint felnőttekben, és a nőstény egyedekben jelentősen magasabb expressziós szintet detektáltak, mint hímekben. Zhang és mtsai (2016) szerint *Drosophilákban* a caveolin-1 elsősorban az agy és az izom fejlődésében, és az izom működésének szabályozásában játszik szerepet.

A szekvencia homológia vizsgálatok azt mutatják, hogy a caveolinok az eukarióták evolúciója során viszonylag későn jelentek meg, specifikusak a gerincesekre és gerinctelenekre, de hiányoznak a gombákból és a növényekből is (növényekben a caveolint sok szempontból helyettesíteni képes flottilin fehérjék vannak jelen). A gerincesek és gerinctelenek caveolin fehérjéi nagyfokú homológiát mutatnak ugyan de funkciójuk, sejten belüli eloszlásuk eltérő. Nem minden fajban képeznek a caveolinok caveolákat, és vannak olyan fajok (pl. *C. elegans*) amelyekben a caveolin csak a plazmamembránon van jelen. A filogenetikai vizsgálatok azt mutatják, hogy caveolin család plaszticitása az ősi caveolin gén nagyszámú fajspecifikus duplikációjának, illetve génvesztésnek az eredménye. Míg emlősökben három féle caveolin izoforma ismert, a génduplikáció eredményeként a csontos halak több mint öt caveolint kódoló génnel rendelkeznek, kétélűekben több mint hatféle caveolint kódoló gén van jelen. Puhatestűekben három-öt caveolin gént mutattak ki. A génvesztés is meglehetősen gyakori az evolúció során. Arra vonatkozóan azonban, hogy van-e olyan faj, amelyben csak egyetlen caveolint kódoló gén lenne jelen nem találtam irodalmi adatot.

Még egyszer szeretném megköszönni Dr. Juhász Gábor opponensemnek, hogy elvállalta munkám bírálatát, köszönöm észrevételeit, megjegyzéseit, kérdéseit. Kérem, fogadja el válaszaimat.

Budapest, 2018. január

Dr. L. Kiss Anna